

バチルス属による食後高血糖改善成分1-デオキシノジリマイシンの生産

著者	小野? 晋司
号	51
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1122号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122753

おのせ しんじ

氏 名（本 籍 地） 小野瀬 晋 司

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1122 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 27 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）生物産業創成科学専攻

論 文 題 目 バチルス属による食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの生産

博士論文審査委員 （主査）教 授 宮澤 陽夫

教 授 山下 まり

准教授 此木 敬一

准教授 仲川 清隆

論文内容要旨

バチルス属による食後高血糖改善成分

1- デオキシノジリマイシンの生産

Production of the α -glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin
from *Bacillus* species

東北大学大学院農学研究科
生物産業創成科学専攻

小野瀬 晋司

指導教員 宮澤 陽夫 教授

緒言

近年、我が国におけるⅡ型糖尿病患者数が急増し、深刻な問題となっている。糖尿病は、網膜症、腎症、神経障害および死亡率の高い心筋梗塞、脳卒中などの深刻な合併症を引き起こす。これら合併症は、患者の QOL を著しく低下させるのみでなく、医療費の増大や、労働力逸失による経済損失増など、経済的に大きな負担を社会に強いる。

そのような中、最近、Ⅱ型糖尿病患者の発症予防に関する大規模臨床試験である

“STOP-NIDDM” 等の検討により、 α -グルコシダーゼ阻害 (α -GI) 薬が、耐糖能障害患の食後高血糖及びインスリン過分泌を抑制することで、Ⅱ型糖尿病発症を予防しうることが報告された¹⁾。こういった背景から、Ⅱ型糖尿病の発症を予防する食品的なアプローチとして、食後高血糖を抑制する食素材の探索が盛んに行われ、有効成分として含有する食品が特定保健用食品として開発されている。

1976 年、Yagi らによって、アザ糖の一種である 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) という化合物が桑の根から単離された²⁾。アザ糖は、桑に特徴的に多く含まれ、単糖の環内酸素原子がイミノ基で置換されている化合物の総称である。この DNJ は α -グルコシダーゼの活性中心に対し、アミノ基の電荷により電気的に結合し、強力な α -GI 活性を発揮する³⁾。桑アザ糖の中で最も含有量が多く、最も α -GI 活性が強いものは DNJ である。そこで当研究室では、DNJ についての簡易分析法 (高極性物質の分離分析に適する親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) と簡便で汎用性の高い蒸発光散乱検出器 (ELSD) を組み合わせた HILIC-ELSD 法) を開発し⁴⁾、DNJ を高含有する桑の品種や部位、収穫時期などを明らかにして、DNJ 高含有桑食品の創出に成功した⁵⁾。この桑食品を用い、健常者および糖尿病境界者において経口シヨ糖負荷試験を行った結果、良好に食後高血糖が抑制される結果が得られた⁶⁾。この DNJ 食品の有効性を機能性食品などに展開するには、従来ほとんど知見が得られていない DNJ の吸収や代謝に関する理解が必須である。

ただ、桑葉を基にした生産物は天候、気候などの外的要因に影響されることもあり、生育の時間が必要な他、葉を処理するにあたりいくつかの加工工程が必要になる。そのため、DNJ を初めとするアザ糖の、ヒトに投与することにより効果が期待できる量の効率的な生産方法が望まれる。アザ糖は、桑の他にツユクサ中に存在すること⁷⁾、放線菌⁸⁾、バチルス属の微生物⁹⁾ による生産が示唆され、そして、微生物のアザ糖の生合成経路が推定されている (Fig. 1)。そして近年では、微生物の発酵による豆チ、浜納豆、清国醬などの食品がアザ糖を有効成分として血糖値を下げることが同定されてきた¹¹⁾。すなわち、微生物、とくに醗酵食品由来の枯草菌等に DNJ を生産させることができれば、新たな DNJ 供給源になる可能性がある。しかし、どのような微生物が DNJ を作りやすいか、またそれらの菌の培養条件が DNJ の生産性に与える影響はあるのか、さらに生合成経路の解明で重要な中間体を明らかにし、遺伝子操作等で DNJ の生産性を向上できるのか、等の検討は行われていない。そこで、本研究ではこれらを明らかにすることを目的とした。

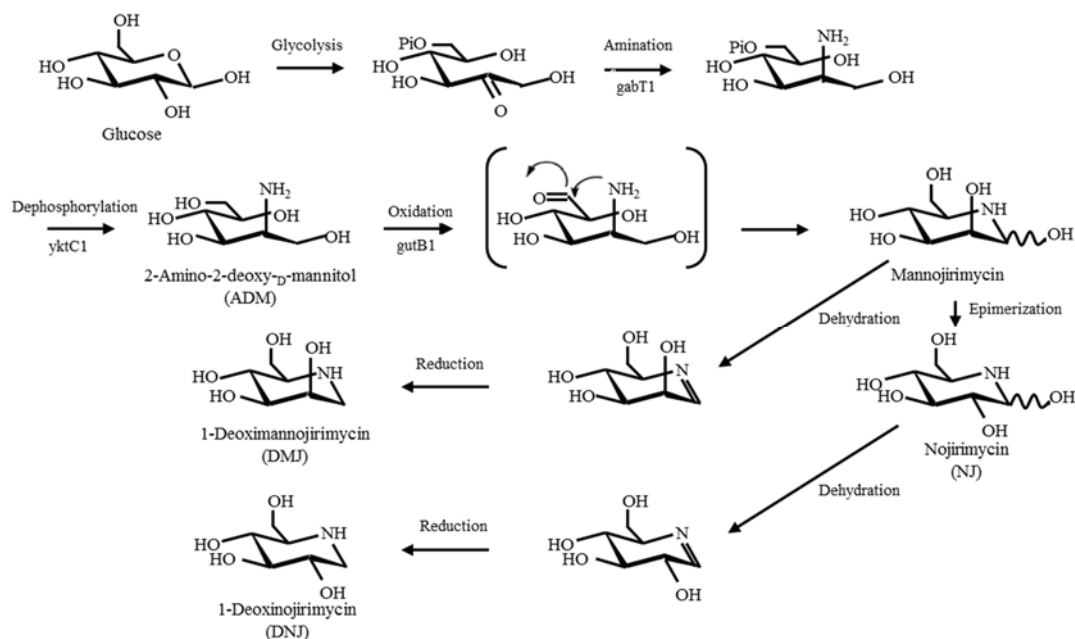


Fig. 1 Microbial biosynthetic pathway of DNJ as proposed.

第 1 章 高 α -グルコシダーゼ阻害活性微生物の選抜と DNJ 生産の評価

第 1 節 α -グルコシダーゼ阻害活性の評価

【目的】1-デオキシノジリマイシン (DNJ) は桑アザ糖の中で最も含有量が多く、最も α -グルコシダーゼ阻害 (α -GI) 活性が強い。ただ、DNJ の供給源としては桑葉がもっぱら用いられているものの、桑葉中の DNJ 濃度は約 0.3 % と低く、産業展開するに当たり供給量が限られていることが大きな課題となっている。一方、バチルス属やストレプトマイセス属の幾つかの菌株の培養液には α -GI 活性が認められており、この阻害活性はアザ糖 (特に DNJ) によるものと推定されている。そこで本節では、微生物による DNJ 生産が新たな DNJ 供給源となる可能性を探ることを目的とした。

【方法】醗酵食品由来の菌株 (約 750 株) を候補株とし、大豆ペプトンを用いて培養し、培地の α -グルコシダーゼ阻害活性を調べ、高活性の菌株を幾つか選抜した。活性が高い菌株において 16SrRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、菌株の系統分類を行った。

【結果】最も高阻害活性が高かったのは B4 と AS385 の 2 種であり、これら菌株の 16SrRNA 遺伝子の塩基配列の結果、枯草菌とその類縁菌に分類される菌株 (*Bacillus subtilis* B4, *Bacillus amyloliquefaciens* AS385) であることがわかった (Table 1, Fig. 2)。

Table 1 α -GI activities of typical *Bacillus* strains measured in this study.

Species and strain	Other designation or Source	Identified	α -glucosidase inhibitory activity
<i>B.subtilis</i> Marburg 168	ATCC 6051,NBRC 13719,DSM10 Type strain	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i> var. natto Miura	Miyagino Natto Seizousyo Inc. Miyagi Japan	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i> var. natto Naruse	Naruse Fermentation Laboratory Co. Ltd. Tokyo Japan	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i> var. natto Takahashi	Yuzo Takahashis' Laboratory Yamagata Japan	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i> var. natto K-2	Asahimatsu Foods Co.Ltd.	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
NBRC101239	DSM 15029 Type strain	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	unknown
NBRC15539	ATCC 49337,DSM 7264 Type strain	<i>B. atrophaeus</i>	unknown
DSM7	ATCC 23350 Type strain	<i>B.amyloliquefaciens</i>	+
DSM704	ATCC 31324 Type strain	<i>B.amyloliquefaciens</i>	+
AS256	Rice straw Tottori Japan	<i>B. atrophaeus</i>	+
AS275	Rice straw Aichi Japan	<i>B.amyloliquefaciens</i>	+
AS384,AS385	Cheonggukjang Marketing product	<i>B.amyloliquefaciens</i>	+
AS422	Rice straw Nagano Japan	<i>B.amyloliquefaciens</i>	+
A1,A2,A3,A4,A5,A6,A7,A8,B1,B2,B3,B5, B6,B7,B8,C1,C2,C3,C4,C6,C7,C8,D1,D2, D3,D4,D5,D6,D7,D8,E1,E2,E3,E4,E5,E6,E 7,E8,F1,F2,F3,F4,F5,F6,F7,F8,G1,G2,G3, G4,G5,G6,G7,G8,H1,H2,H3,H4,H5,H6,H7, H8	Douchi Marketing product	<i>B.amyloliquefaciens</i>	+
B4	Douchi Marketing product	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	+
A9,A10,A11,A12,B9,B10,B11,B12,C9,C10 ,C11,C12,D9,D10,D11,D12,E9,E10,E11,E1 2,F9,F10,F11,F12,G9,G10,G11,G12,H9,H1 0,H11,H12,	Hamanatto Marketing product	<i>B.amyloliquefaciens</i>	+

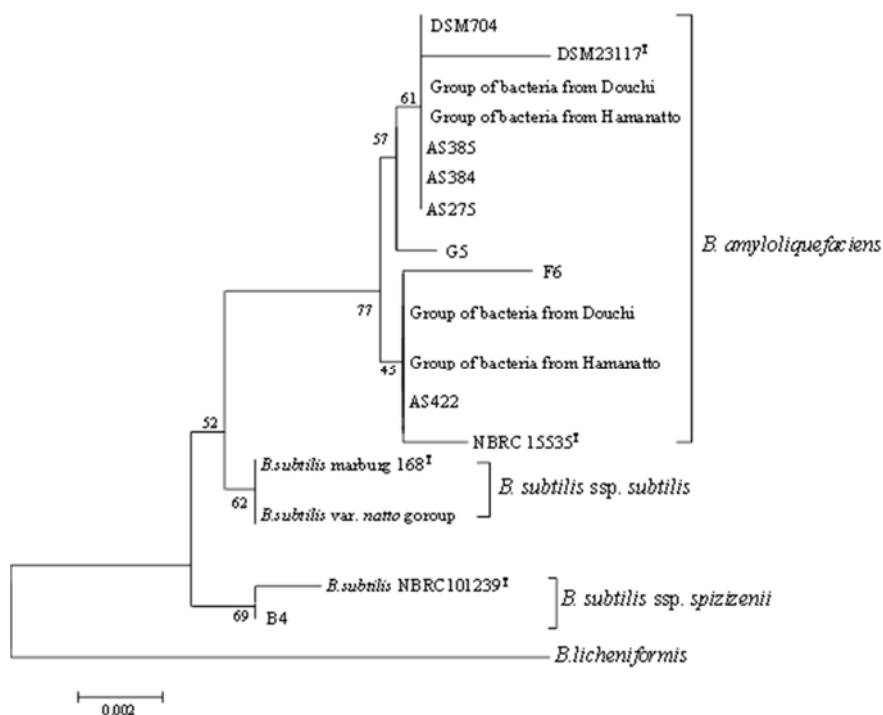


Fig. 2 A phylogenetic tree based on a partial sequence of 16S rDNA (ranging 16 from 65 to 727 bp).

第 2 節 高 α -グルコシダーゼ阻害活性微生物による DNJ 生産の確認と評価

【目的】第 1 節で得られた結果により、強い α -グルコシダーゼ阻害 (α -GI) 活性を持つ菌株が、枯草菌とその類縁菌に分類される菌株 (*Bacillus subtilis* B4、*Bacillus amyloliquefaciens* AS385) であることがわかった。本節では、これらの菌株が確かに DNJ を高生産することを LC-MS/MS 分析で明らかにした。

【方法】B4 と AS385、比較として DNJ を作ることが古くから報告されている *Bacillus subtilis* DSM704 を、実際の生産を想定して大豆ペプトンを用い、種々の炭素源 (グルコース、ガラクトース、ラクトース、ソルビトール) を添加した条件で培養し、菌体と培養液中のアザ糖を LC-MS/MS で測定した。

【結果】B4 と AS385、DSM704 の菌体と培養液のアザ糖を LC-MS/MS で分析し、これらに含まれるアザ糖類が DNJ であることを確認した (Fig. 3)。さらに、DNJ と同程度に、前駆体と考えられる 2-amino-2-deoxy-D-mannitol (ADM) が存在することを見出した。DSM704 に比べて、B4 と AS385 の DNJ 生産量ははるかに多く、培地にガラクトースやソルビトールを加え培養すると、とくに AS385 では DNJ 生産量がさらに増加することがわかった (Fig. 4)。

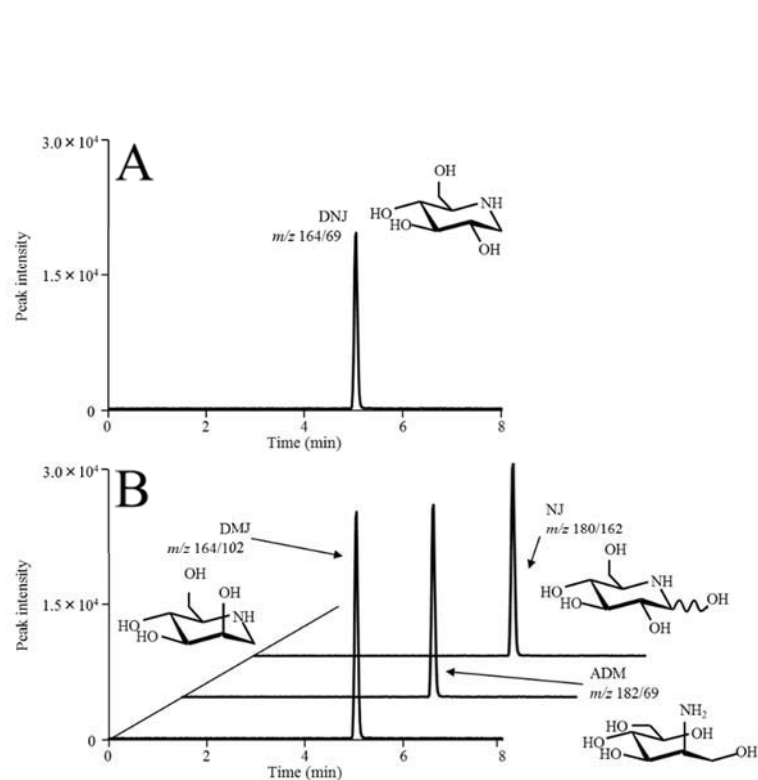


Fig. 3 HILIC-MS/MS analysis of DNJ and its precursors. (A) Shown is MRM chromatograms of DNJ of microbial (*B. subtilis* DSM704) culture medium extracts. (B) Shown are MRM chromatograms of ADM, NJ, and DMJ, when microbial culture medium extracts were analyzed by HILIC-MS/MS with MRM (expansion mode).

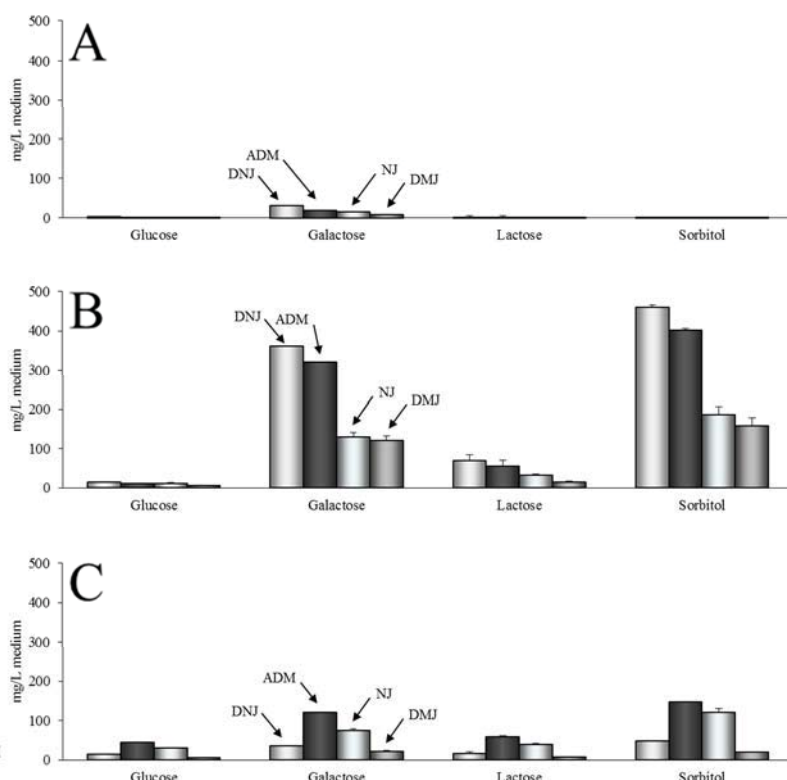


Fig. 4 DNJ and precursor (ADM, NJ, and DMJ) concentrations in medium of *B. amyloliquefaciens* AS385, (A), *B. subtilis* B4, (B), or *B. subtilis* DSM704, (C). Iminosugars in the culture medium were analyzed by HILIC-MS/MS. Data represent the means \pm SD ($n = 3$).

第 3 節 経時的な DNJ 生産と遺伝子発現量の評価

【目的】第 2 節で得られた結果から、培地に炭素源を添加することで、DNJ 生産性が高まる新たな知見を得ることが出来た。また、DNJ と同程度に、培地中には前駆体と考えられる 2-amino-2-deoxy-D-mannitol (ADM) が含まれていた。つまり、ADM から DNJ へ代謝変換を促進することが出来れば、微生物培養で極めて多量の DNJ を生産でき、十分な DNJ 供給源となると考えられる。そこで本節では、微生物の DNJ 生合成経路に関わる遺伝子発現量を経時的に調べることで、DNJ 生産との関連を明らかにしようとした。

【方法】第 2 節で得られた結果より、最も DNJ 生産量の多かった *Bacillus amyloliquefaciens* AS385 を使用し、実際の生産を想定して大豆ペプトンを用い、炭素源（グルコース、ソルビトールの 2 種で比較）を添加した条件で培養した。菌体と培養液中のアザ糖を LC-MS/MS で測定し、*gabT1* 遺伝子発現量を定量 Real-time PCR を用い経時的に調べた。

【結果】まず始めに、培養液中アザ糖の経時的な生産量を調べた。微生物の DNJ 生産は、生合成経路 (Fig. 1) の順に従い、炭素源から DNJ へと変換される。中間体である 2-amino-2-deoxy-D-mannitol (ADM) が DNJ へと代謝されるため、培養液中の ADM 濃度は低い傾向にあるはずだが、培養 24 時間以降も高いままであった (Fig. 5)。従って、DNJ 生産量は頭打ちになることが示唆された。そこで次に、経時的な *gabT1* 遺伝子発現量の比較をした (Fig.6)。*gabT1* 遺伝子は、Amination をコードする遺伝子であり、ADM の生合成に関係する。*gabT1* 遺伝子は培養 9-24 時間時で多く発現し、それ以降、減少傾向にあった。つまり、*gabT1* 遺伝子以降の ADM 生合成、変換に関する遺伝子発現を高めることが出来れば、大量の DNJ 生産を可能とすることが示唆された。

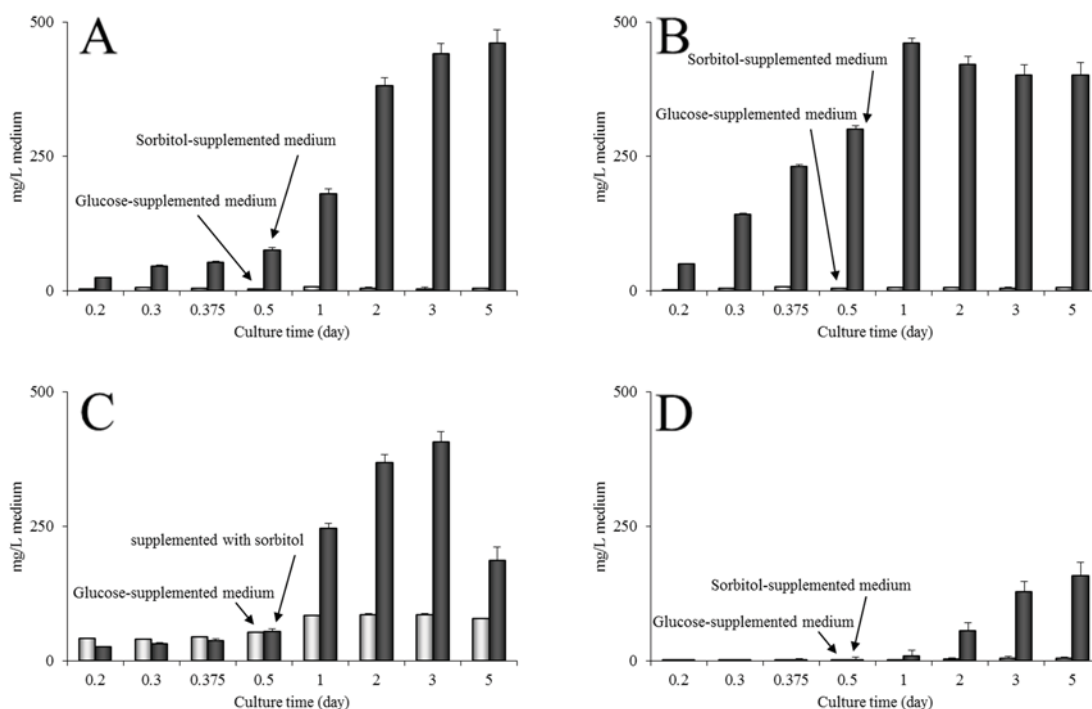


Fig. 5 Time-course changes of DNJ (A) and precursor ADM (B), NJ (C), and DMJ (D) concentration in culture medium of *B. amyloliquefaciens* AS385. *B. amyloliquefaciens* AS385 was cultured at 37 °C with reciprocal shaking at 90 rpm for 0–5 days in a 500 ml shaking flask containing 50 ml of 4% soybean peptone supplemented with 5% carbon source (glucose or sorbitol). Iminosugars in the culture medium were analyzed by HILIC–MS/MS. Data represent the means ± SD (n = 3).

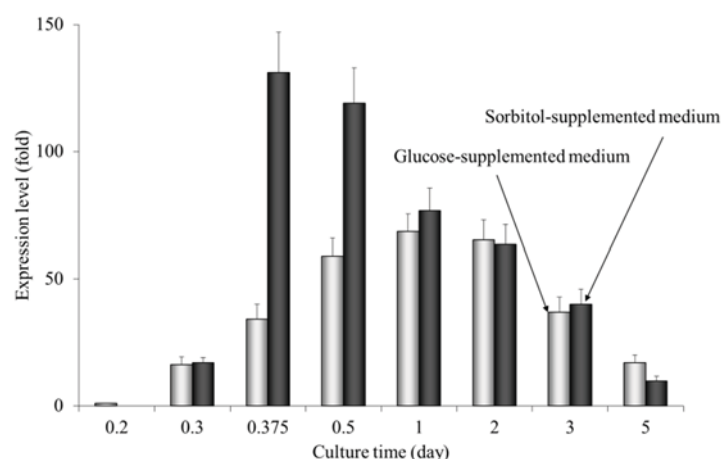


Fig. 6 Time-course changes of *gabT1* mRNA expression in *B. amyloliquefaciens* AS385. Data represent the means \pm SD (n = 3).

第 2 章 *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 による DNJ 高生産メカニズムの解明

第 1 節 培養条件 (C/N 比) が DNJ 生産性に与える影響

【目的】第 1 章で得られた知見から、培養条件を変えることで DNJ 前駆体や DNJ 自体の生産量を大幅に増加させることに成功した。また、ソルビトールを炭素源として用いることで、*Bacillus amyloliquefaciens* AS385 では DNJ 前駆体の一つである 2-amino-2-deoxy-D-mannitol (ADM) 生産にも強い影響を及ぼす結果にもなった。そこで本節では、この高生産メカニズムを詳細に調べていくために、全ゲノムが解析されている *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 を用いて、DSM7 の DNJ 生産性にもっとも影響を与える培養条件を明らかにした。

【方法】試験菌株として培養液に α -グルコシダーゼ阻害 (α -GI) 活性が認められ、DNJ を生産すると報告されており、既に全ゲノムがわかっている *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 を用い、培養液の DNJ 生産の確認、あるいは DNJ 前駆体の探索を行った。培地には合成培地を用い、そこに DNJ の原料となる種々の炭素源 (C 源：グルコース、ガラクトース、ラクトース、ソルビトール) および窒素源 (N 源：硫酸アンモニウム) 濃度を変えた種々の条件で 5 日間培養し、培養液の DNJ 量を LC-MS/MS で分析した。

【結果】C 源としてラクトースを培地に加えると、DNJ の生産量が 10 倍以上増加することがわかった (Fig. 7)。さらに、C/N 比を 6.25 (C 源：2.5%, N 源：0.4%) とした時に、生産量は最大で 1.2 g/L に達した (Fig. 8)。また、培地から DNJ 前駆体はほとんど検出されず (data not shown)、このことも DNJ 高生産の一因と考えられた。

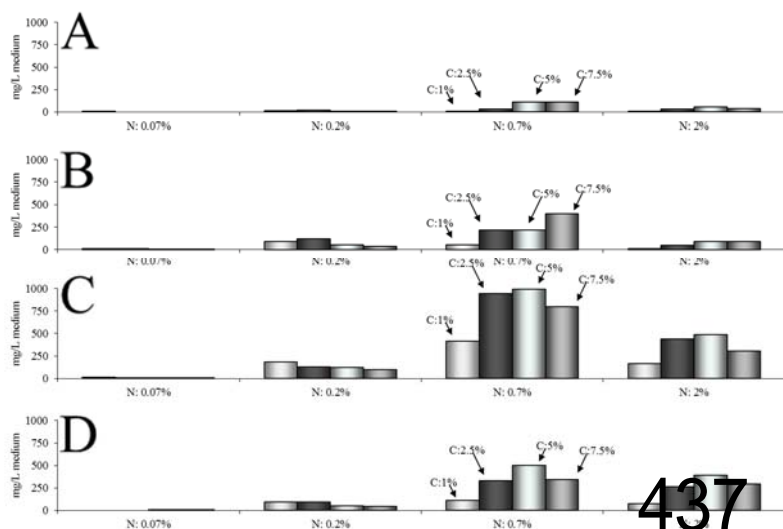


Fig. 7 DNJ concentrations in medium of *B. amyloliquefaciens* DSM7. *B. amyloliquefaciens* DSM7 was cultured at 37 °C with reciprocal shaking at 90 rpm for 0–5 days in a 500 ml shaking flask containing 50 ml of synthetic culture medium supplemented with 1–7.5 % carbon source (glucose (A), galactose (B), lactose (C) or sorbitol (D)) and 0.07–2.0 % nitrogen source (ammonium sulfate). DNJ in the culture medium were analyzed by HILIC–MS/MS. Data represent the means (n = 1).

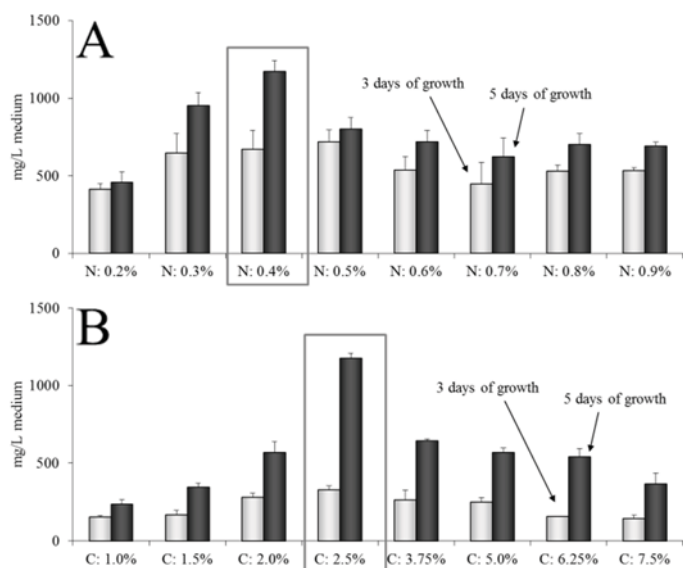


Fig. 8 DNJ concentrations in medium of *B. amyloliquefaciens* DSM7. *B. amyloliquefaciens* DSM7 was cultured at 37 °C with reciprocal shaking at 90 rpm for 0–5 days in a 500 ml shaking flask containing 50 ml of synthetic culture medium supplemented with (A) 2.5% carbon source (lactose) and 0.2–0.9% nitrogen source (ammonium sulfate) or (B) 1.0–7.5% carbon source (lactose) and 0.4% nitrogen source (ammonium sulfate). DNJ in the culture medium were analyzed by HILIC–MS/MS. Data represent the means \pm SD ($n = 3$).

第 2 節 C/N 比固定培養条件における経時的な DNJ 生産性

【目的】第 1 節で得られた結果により、C 源（ラクトース）を 2.5 % 濃度、N 源を 0.4 % 濃度となるよう培地中に添加した条件（C/N 比 = 6.25）で、最も DNJ 生産性が高いことを見出した。そこで、C/N = 2.5%/0.4% のこの条件で、経時的な DNJ 生産性を明らかにしようとした。

【方法】C 源にラクトースあるいは比較としてグルコースを用いた C/N 比 = 6.25 の条件について、培地炭素源に濃度勾配を持たせ、経時的な DNJ 生産性の検証を行った。また、培養液中の炭素源消費量推移を測定し、DNJ 生産性との関係を調べた。さらに、経時的に採取した培養液を遠心分離し、分離して得られた菌体から ATP を抽出し、生菌数の測定を行い、DNJ 生産性との関係性を調べた。

【結果】DNJ は培養 1–3 日に急激に生産されていることがわかった。炭素源やその濃度勾配により、DNJ の消長が明瞭に分かれ、かつ培養 5 日目においては、培地中の DNJ 濃度は 1g/L を超えた。以上の結果と、培地に含まれる糖（ラクトース）および ATP 濃度の推移から、DNJ 生産にはカタボライトリプレッションが深く関与することが新たに示唆された (Fig. 9)。加えて、本条件下では、培地から DNJ 前駆体はほとんど検出されず、このことも DNJ 高生産の一因と考えられた。また、培養 4–5 日目にかけても DNJ 生産量が増加傾向にあるため、培養期間を延ばすことで DNJ 蓄積量がさらに高まる可能性も示唆された。

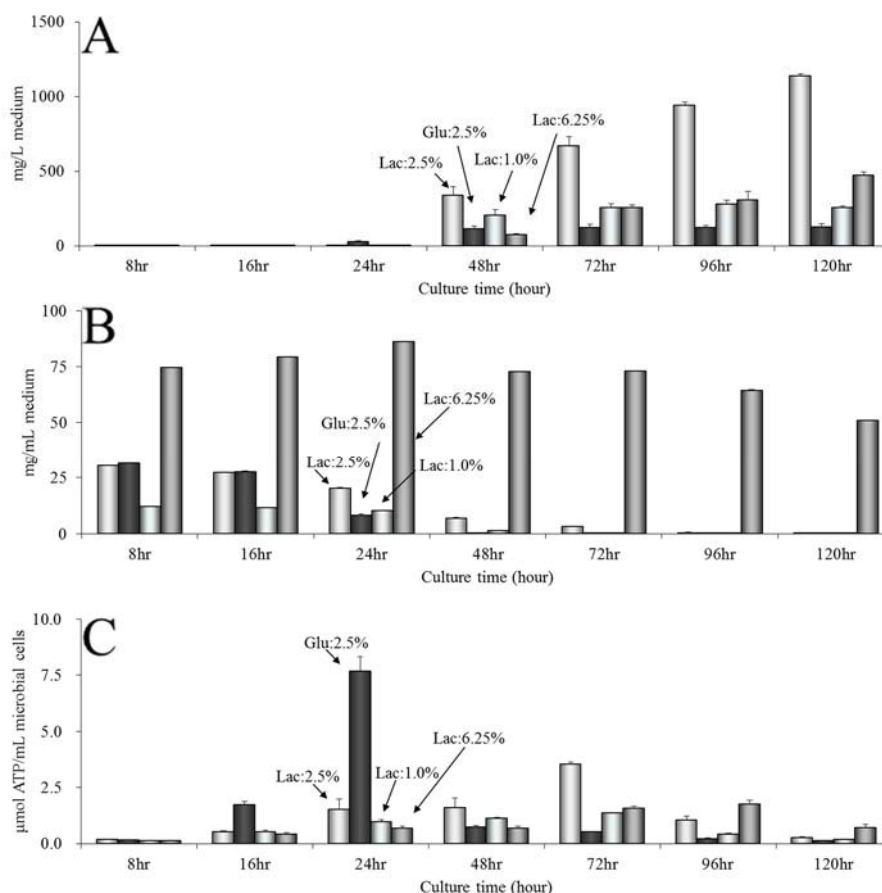


Fig. 9 (A) Shown is the time-course changes of DNJ concentration in culture medium of *B. amyloliquefaciens* DSM7. *B. amyloliquefaciens* DSM7 was cultured at 37 °C with reciprocal shaking at 90 rpm for 0–5 days in a 500 ml shaking flask containing 50 ml of synthetic culture medium supplemented with 1, 2.5 or 6.25 % carbon source (glucose or lactose) and 0.16, 0.4 or 1.0 nitro source (ammonium sulfate). (B) shown is the time-course changes of carbon concentration in culture medium of *B. amyloliquefaciens* DSM7 and (C) shown is the time-course changes of ATP concentration in cell of *B. amyloliquefaciens* DSM7. *B. amyloliquefaciens* DSM7. Iminosugars in the culture medium were analyzed by HILIC–MS/MS. Data represent the means \pm SD (n = 3).

第 3 節 微生物生産によるアザ糖 DNJ の精製

【目的】第 1 節、第 2 節で得られた結果により、C 源 (ラクトース) を 2.5 % 濃度、N 源を 0.4 % 濃度となるよう培地中に添加した条件 (C/N 比 = 6.25) で、最も DNJ 生産性が高いことを見出した。そこで、最適条件下で DNJ を生産し、単離精製を試みた。

【方法】第 2 節で得られた結果より、最適条件下 (C/N 比 = 6.25) で DNJ 生産を試みた。C 源にラクトース、N 源に硫酸アンモニウムあるいはラベル化硫酸アンモニウム (安定同位体 ^{15}N でラベル) とする合成培地にて 5 日間、16L 培養した。得られた培養上清を強陽イオンカラム (アンバーライト IR-120B (H^+)) に供し、水で洗浄後、0.5 N のアンモニア水で溶出した。溶出液を真空濃縮し、これを強陰イオンカラム (ダウエックス 1 \times 2) に供した。水で洗浄し、洗浄液を真空濃縮した後、水分を除去したものを DNJ およびラベル化 DNJ とした (Fig. 10)。

【結果】DNJ およびラベル化 DNJ を高濃度に含む粉末を約 10 グラム得られた。精製し

た DNJ を LC-MS/MS で分析し、これらに含まれるアザ糖類が DNJ であることを確認した (Fig. 11)。精製 DNJ の一部には、立体異性体である 1-deoxymannojirimycin (DMJ) を含む可能性も示唆される (Fig. 1)。微生物によるアザ糖生産は、安価な DNJ 供給源としての活用が期待されるため、現在、NMR にてこの精製 DNJ の詳細な構造解析を進めている。



Fig. 10 Crystal of DNJ

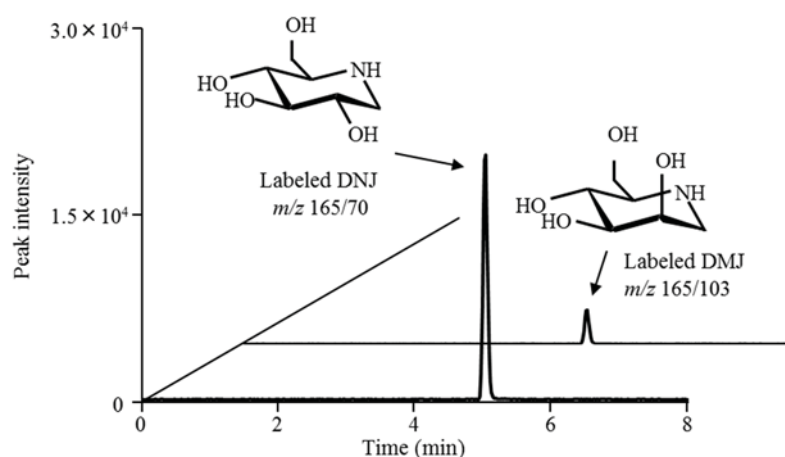


Fig. 11 Shown is MRM chromatograms of labeled DNJ and labeled DMJ of microbial (*B. subtilis* DSM704) culture medium extracts, when microbial culture medium extracts were analyzed by HILIC-MS/MS with MRM (expansion mode).

第 3 章 ラットにおけるアザ糖の体内動態の解明

第 1 節 ラットにおけるアザ糖の吸収および排泄動態の解明

【目的】第 1 章、第 2 章の結果により、微生物を最適培地で培養することで、アザ糖を高生産できることが示唆された。アザ糖 DNJ が機能性食材として展開されるためには、その安全性と効能発現メカニズムを十分に科学的に検証する必要がある。本研究では、安定同位体 ^{15}N でラベルしたラベル化 DNJ を用い、DNJ の吸収や蓄積、代謝、排出バランスを明らかにすることで、生体内動態を解明することを目的とした。

【方法】ラットに DNJ およびラベル化 DNJ (投与量 3 mg/kg B.W) を経口投与し、血液や尿、糞を経時的に採集し、得られた血漿サンプル、尿、糞検体サンプルを HILIC-MS/MS により分析した。

【結果】始めに、DNJ およびラベル化 DNJ について、3 mg/kg B.W の経口投与で確かにラット血漿に移行することを LC-MS/MS で確認した。次いで、ラット血中への移行を経時的に調べた。DNJ およびラベル化 DNJ (投与量 3 mg/kg B.W) はともに、投与 0.5 時間で血漿濃度が最大 (DNJ 4.5 $\mu\text{g/mL}$, ラベル化 DNJ 4.6 $\mu\text{g/mL}$) に達し、その後、速やかに減少することがわかった (Fig. 12)。また、投与 24 時間後には、これらの大部分は尿や糞中に排泄されることを認めた (Table 2)。尿中排泄量から算出したこれらのラット体内への吸収量

は、摂取量の約 45% と見積もられた。以上から、DNJ およびラベル化 DNJ の経口摂取により、その一部が消化管から吸収されて血中に移行し、短時間の間に体外へ排出されることが示唆された。ただし、DNJ とラベル化 DNJ をラットに経口投与した際、尿や糞に排泄された総量は投与量に達しなかった。そこで現在、ラベル化 DNJ を用いた DNJ の臓器への蓄積や、DNJ 代謝物同定へと研究を進め、さらなる動物実験を行っている。

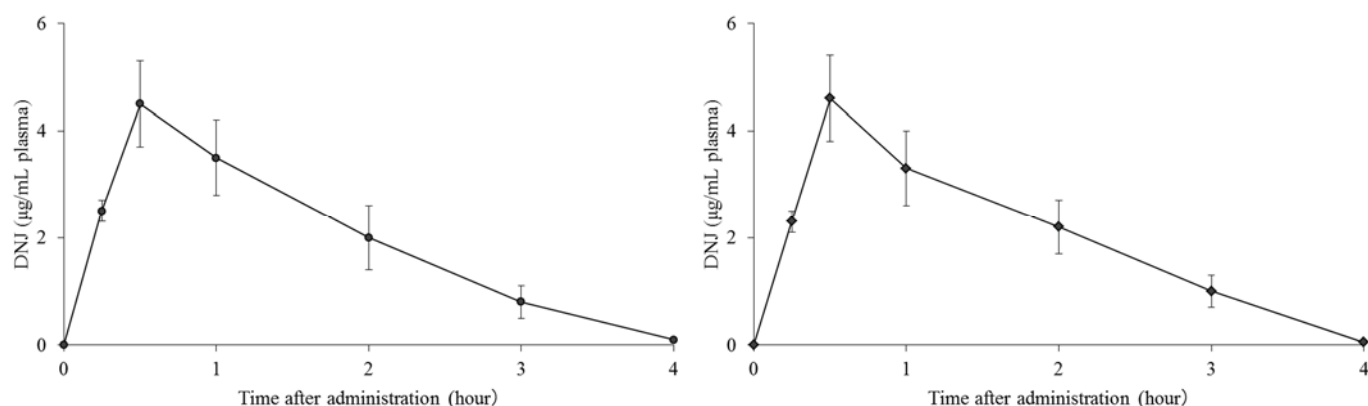


Fig. 12 Concentration of 1-deoxynojirimycin (DNJ) in rat plasma after a single oral administration of DNJ (A) or labeled DNJ (B). Time course changes in the DNJ concentration in the plasma of rats receiving DNJ (12 mg/kg of body weight). Data represent the means \pm SD (n = 4).

Table 2 Time course changes in the DNJ concentration in the urine and feces of rats receiving DNJ (12 mg/kg of body weight).

Compound	Period	In urine (mg)	% of dose	S.D. (dose)
DNJ 3mg	0-24 h	1.38	46.0	4.21
	24-48 h	0.09	3.0	2.74
	48-72 h	trace	trace	-
labeled DNJ 3 mg	0-24 h	1.32	44.0	4.37
	24-48 h	0.12	4.0	3.02
	48-72 h	trace	trace	-

Data represent the means \pm SD (n = 4).

Compound	Period	In feces (mg)	% of dose	S.D. (dose)
DNJ 3mg	0-24 h	0.79	26.3	3.78
	24-48 h	trace	trace	-
	48-72 h	N.D.	N.D.	-
labeled DNJ 3 mg	0-24 h	0.65	21.7	2.98
	24-48 h	trace	trace	-
	48-72 h	N.D.	N.D.	-

Data represent the means \pm SD (n = 4).

総括

本論文では、産業展開するに当たり供給量が限られていることが大きな課題となっており、1-デオキシノジリマイシン (DNJ) の新たな供給方法と、その安全性に絡み体内への吸収、動態、排泄の解明への一助とすることを目的とした。

第 1 章では、強い α -グルコシダーゼ阻害 (α -GI) 活性を持つ菌株が確かに DNJ を高生産することを確認、培養条件を変えることで DNJ 前駆体や DNJ 自体の生産量を大幅に増加させることを明らかにした。この知見により、微生物培養が DNJ の新たな供給源となり得る可能性が示された。

第 2 章では、DNJ の高生産メカニズムの解明にせまり、最適培養条件を突き詰めることで DNJ の高生産を可能とした。また、培養液から DNJ 単離精製を可能とし、生体での体内動態を解明への普及体制を整えることができた。この知見により、DNJ の糖尿病予防効果への研究展開できる可能性が示された。

第 3 章では、単離精製した DNJ を中心としたアザ糖について、ラットにおける吸収・排泄動態を解明することを目的とした。ラットに経口摂取されたアザ糖は、体内に蓄積せず、食品に含まれる成分として摂取した際も、体内動態の面から見て安全であることが示唆された。

本研究の成果が元となり、今後のアザ糖関連食品の発展や、アザ糖の新規生理作用の探索に応用することが目標である。

引用文献

- 1) Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M; STOP-NIDDM Trial Research Group. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*. 2002; 15; 359(9323): 2072-7.
- 2) Yagi M, Kouno T, Aoyagi Y, Murai H. The structure of moraoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species. *Nippon Nougei Kagaku Kaishi*. 1976; 50: 571-2.
- 3) Junge B, Matzke M, Stliefuss J. Chemistry and structure-activity relationships of glucosidase inhibitors. In Handbook of experimental pharmacology. Eds. Kuhlmann J, Puls W. *Springer-Verlag. New York*. 1996; 119: 411-82.
- 4) Kimura T, Nakagawa K, Saito Y, Yamagishi K, Suzuki M, Yamaki K, Shinmoto H, Miyazawa T. Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 1415-8.
- 5) 宮澤陽夫 他. 農林水産研究高度化事業. 血糖値改善効果を有する桑葉製品開発. 2004-2006.
- 6) Kimura T, Nakagawa K, Kubota H, Kojima Y, Goto Y, Yamagishi K, Oita S, Oikawa S, Miyazawa T. Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. *J Agric Food Chem*. 2007; 55 (14): 5869-74.
- 7) Kim HS, Kim YH, Hong YS, Paek NS, Lee HS, Kim TH, Kim KW, Lee JJ. Alpha-Glucosidase inhibitors from *Commelina communis*. *Planta Med*. 1999; 65(5): 437-9.
- 8) Ezure Y., Maruo S., Miyazaki K., Kawamata, M. Moranoline (1-deoxynojirimycin) fermentation and its improvement. *Agricultural and biological chemistry*. 1985; 49: 1119-25.
- 9) Stein D. C., Kopec L. K., Yasbin R. E. Young F. E. Characterization of *Bacillus subtilis* DSM704 and its production of 1-deoxynojirimycin. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984; 48: 280-84.
- 10) Clark L. F., Johnson J. V., Horenstein N. A. Identification of a gene cluster that initiates azasugar biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*. *ChemBioChem*. 2011; 12: 2147-2150.
- 11) Yun-Ping Zhu, Kohji Y, Tadashi Y, Mayumi O, Xiu-Ting Li, Yong-Qiang Cheng, Yutaka M, Li-Te Li. Purification and Identification of 1-Deoxynojirimycin (DNJ) in Okara Fermented by *Bacillus subtilis* B2 from Chinese Traditional Food (Meitaoza). *J Agric Food Chem*. 2010; 58: 4097-4103.

国際学会

- [1] Shinji Onose, Akira Asai, Kiyotaka Nakagawa, Toshiyuki Kimura, Shinichi Oikawa, Teruo Miyazawa, Effect of mulberry 1-deoxynojirimycin on postprandial glycemic control, 11th Maillard reaction symposium, National Polytechnic Institute of Lorraine, Nancy, France (March 2012)
- [2] Shinji Onose, Chaluntorn Vichasilp, Kiyotaka Nakagawa, Ohki Higuchi, Fumiko Kimura, Teruo Miyazawa, Preparation of mulberry 1-deoxynojirimycin-entrapped microsphere for a prolonged hypoglycemic effect, 14th International Conference on Surface and Colloid Science (IACIS2012), S5P17-01, Sendai International Center, Sendai, Japan (May 2012)

論文審査の結果の要旨及び担当者	
氏 名	小野瀬 晋司
審 査 委 員	主査：教授 宮澤 陽夫 副査：教授 山下 まり 准教授 此木 敬一 准教授 仲川 清隆
学 位 論 文 題 目	バチルス属による食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの生産

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、我が国におけるⅡ型糖尿病患者数が急増し、深刻な問題となっている。糖尿病は、網膜症、腎症、神経障害および死亡率の高い心筋梗塞、脳卒中などの深刻な合併症を引き起こす。これら合併症は、患者のQOLを低下させるのみでなく、医療費の増大や、労働力逸失による経済損失増など、大きな負担を社会に強いる。

アザ糖の一種である 1-デオキシノジリマイシン(DNJ)は、桑に特徴的に多く含まれ、単糖の環内酸素原子がイミノ基で置換した化合物の総称である。この DNJ は α -グルコシダーゼの活性中心に対し、アミノ基の電荷により電気的に結合し、有効な α -グルコシダーゼ阻害(α -GI)活性を発揮する。

これまで、DNJ を高含有する桑の品種や部位、収穫時期などが明らかにされて、DNJ 高含有桑食品も創出されている。この桑食品を用い、健康者および糖尿病境界者において経口ショ糖負荷試験を行った結果、良好に食後高血糖が抑制される結果が得られている。この DNJ 食品の有効性を機能性食品などに展開するには、DNJ の吸収や代謝に関する理解が必須である。

桑葉を原料にした生産物は、天候、気候などの外的要因に影響されることもあり、生育の時間とともに、葉を処理するためのいくつかの加工工程が必要になる。そのため、DNJ を含むアザ糖の、ヒトに投与し効果

が期待できる量の効率的な生産方法が望まれる。近年では、微生物発酵による豆チ、浜納豆などの食品がアザ糖を有効成分として血糖値を下げる事が報告されている。すなわち、微生物、とくに醗酵食品由来の枯草菌等に DNJ を生産させることができれば、新たな DNJ 供給源になる可能性がある。本博士論文では、どのような微生物が DNJ を作りやすいか、またそれらの菌の培養条件が DNJ の生産性に与える影響はあるのか、さらに生合成経路の解明で重要な中間体を明らかにし、遺伝子操作等で DNJ の生産性を向上できるのか、これらを明らかにすることを目的とした。

本論文では、産業展開するに当たり供給量が限られていることが大きな課題となっている 1-デオキシノジリマイシン(DNJ)の新たな供給方法の確立と、その安全性を検討するため体内への吸収、動態、排泄の解明を目的とした。

第一章では、強い α -GI 活性を持つ菌株が確かに DNJ を高生産することを確かめ、培養条件を変えることで DNJ 前駆体や DNJ 自体の生産量を大幅に増加させることを明らかにした。この知見により、微生物培養が DNJ の新たな供給源となる可能性が示された。

第二章では、DNJ の高生産メカニズムの解明にせまり、最適培養条件を突き詰めることで DNJ の高生産を可能とした。また、培養液から DNJ 単離精製することを可能とし、生体の体内動態を解明する体制を整えることができた。この知見により、DNJ の糖尿病予防効果への研究展開を可能にした。

第三章では、単離精製した DNJ を中心としたアザ糖について、ラットにおける吸収と排泄動態の解明を目的とした。ラットに経口摂取されたアザ糖は、体内に蓄積せず排泄されやすく、食品に含まれる成分として摂取した際も、体内動態の面から見て安全であることを明らかにした。

本博士論文では DNJ の新たな供給方法を構築し、DNJ の体内動態について新たな知見を明らかにした。すなわち、微生物の培養条件を変えることで DNJ 生産性を大きく増加させ、微生物培養液より DNJ の単離精製に成功し、単離精製した DNJ を中心としたアザ糖のラットにおける吸収・排泄動態を明らかにした。本成果は今後のアザ糖関連食品の開発応用に大きく貢献すると思われる。よって、審査員一同は博士(農学)の学位に値するものと認定した。